

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie



Ing. Milada Chudičková

Cílené diferenciaci a transferenciace kmenových buněk a jejich terapeutické využití

Targeted differentiations and transdifferentiations of stem cells and their therapeutic application

Dizertační práce

Školitel: prof. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 6. 2016

Děkuji prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. a PharmDr. Šárce Kubinové, Ph.D. za věnovaný čas a odborné vedení doktorského projektu. Dále děkuji BA (Hons) Edwardu T. Everettovi a RNDr. Aleně Zajícové, CSc. za pečlivé přečtení disertační práce a cenné připomínky.

Abstrakt

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) přirozeně vytváří a regenerují mezodermální tkáň, jako je chrupavka, kost nebo tuková tkáň. Vlivem specifických podnětů z okolního prostředí jsou však do určité míry schopny transdiferencovat do endodermálních či ektodermálních typů buněk. Kromě toho mají schopnost regulovat zánětlivé procesy a přispívat k hojení a regeneraci. Jsou tedy vhodným nástrojem pro buněčnou terapii a tkáňové inženýrství. Vlastnosti MSC se liší v závislosti na tom, z jaké tkáně pocházejí, zejména pak jejich diferenciační a proliferační potenciál a spektrum sekretovaných cytokinů. Tyto odlišnosti mohou být dále zvýrazněny specifickými nároky prostředí, v němž mají MSC působit. Proto je vhodné optimalizovat v závislosti na prostředí výběr MSC tak, aby byl maximalizován jejich přínos. Hlavním úkolem této práce bylo vyvinout *in vitro* protokol pro transdiferenciaci MSC do buněk podobných neuronům. V tomto případě se nejlépe osvědčily MSC získané z tukové tkáně, což může být zdůvodněno jejich vyšší schopností produkce bazického fibroblastového růstového faktoru, klíčového činitele ve vývoji nervového systému. Výsledné buňky podobné neuronům vykazovaly typickou neuronální morfologii, exprimovaly geny pro neuronální markery a produkovaly proteiny kódované těmito geny. Zároveň vykazovaly imunoregulační schopnosti srovnatelné s nediferencovanými MSC; snižovaly produkci IFN- γ a podporovaly produkci IL-10 v aktivovaných splenocytech. Mohly by tedy být použity jak pro své protizánětlivé vlastnosti, tak pro náhradu poškozených neuronů. V případě regenerace poškozené králičí rohovky se jako vhodnější jeví MSC získané z kostní dřeně, které jsou v tomto prostředí schopny nahradit svým terapeutickým působením chybějící limbální kmenové buňky.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) naturally differentiate into cells of tissues of mesodermal lineage: cartilage, bone or adipose tissue. As a result of specific environmental stimuli, MSC are able to transdifferentiate into cells of endodermal or ectodermal lineage. Also, MSCs are able to regulate the inflammatory processes and to support healing and regeneration. These properties make MSCs suitable in cell-based therapy and tissue engineering. Characteristics of MSCs (for example differentiation and proliferative potential and cytokine secretion profile) can vary slightly depending on their origin. These differences can be further amplified by the effects of specific environments. Thus, to obtain maximal benefit, it is important to select MSCs optimal for a particular environment. The main goal of this thesis was to design *in vitro* protocol for transdifferentiation of MSCs into neuron-like cells. For this application, the adipose tissue-derived MSCs seemed to be optimal, due to their higher production of basic fibroblast growth factor, one of the important factors in neural development. The resulting cells acquired typical neuron-like morphology, expressed genes for neuron-specific markers and produced neuron-specific proteins. Further, the resulting cells showed immunomodulatory properties similar to non-differentiated MSCs; they suppressed the production of IFN- γ and supported the production of IL-10 in activated splenocytes. Thus, these neuron-like cells could both be used for their anti-inflammatory effect, as well as for replacement of lost neuronal cells. By contrast, in a case of injured rabbit cornea, bone marrow-derived MSCs showed better results in the healing of the injury, compared to adipose tissue-derived MSCs, and were able to substitute the role of absent limbal stem cells.

Content

1	List of abbreviations.....	7
2	Introduction.....	9
2.1	Stem cells.....	9
2.1.1	Tissue-specific stem cells.....	10
2.2	Mesenchymal stem cells.....	11
2.3	Neural stem cells.....	15
2.3.1	Neural differentiation of pluripotent stem cells.....	17
2.3.2	Neuronal transdifferentiation of multipotent stem cells.....	18
2.4	Limbal stem cells.....	23
2.4.1	Corneal epithelial differentiation of pluripotent stem cells.....	24
2.4.2	Corneal epithelial transdifferentiation of multipotent stem cells.....	25
2.5	Other applications and perspectives of stem cell-based therapy.....	26
3	Aims of thesis.....	28
4	List of publications.....	30
4.1	Thesis publications.....	30
4.2	Other publications.....	30
5	Results.....	31
5.1	Targeted neural differentiation of murine mesenchymal stem cells by a protocol simulating the inflammatory site of neural injury.....	31
5.2	The characterization of the immunomodulatory potential of neuron-like cells – the unpublished results.....	42
5.3	The optimization of the differentiation protocol for human AT-MSCs – the unpublished results.....	43
5.4	The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process.....	44
5.5	A comparative study of the therapeutic potential of mesenchymal stem cells and limbal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction.....	55
6	Discussion.....	69
7	Conclusions.....	72
8	References.....	73